Zur Kenntnis der lipoiden Substanzen der Magenschleimhaut.

Inaugural-Dissertation

der

medizinischen Fakultät

der

Kaiser Wilhelms-Universität Strassburg

zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

KURT BAYER

aus

STRASSBURG i. E.

z. Z. im Felde.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

STRASSBURG i. E.

Els.-Lothr. Druckerei u. Lithogr.-Anstalt G. m. b. H., Dreizehnergraben 45.

1915.

Gedruckt mit der am 24. Juli 1914 erteilten Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Strassburg i. E.

Referent: Prof. Dr. Hofmeister.

In einer vor 5 Jahren erschienenen Dissertation hat H. Wieland[1]) über die lipoiden Substanzen der Magenschleimhaut berichtet. Da in dieser Arbeit einzelne Fragen unerledigt blieben, habe ich die Untersuchung an grösserem Material fortgesetzt.

Bevor ich auf die Wiedergabe meiner Untersuchungen eingehe, erscheint es wünschenswert, der Nomenclatur der sogenannten Lipoide gegenüber Stellung zu nehmen. Bekanntlich hat Overton beobachtet, dass „alle solche Verbindungen, welche in fetten Ölen und ähnlichen Lösungsmitteln leicht löslich sind, resp. leichter löslich sind als in Wasser, durch den lebendigen Protoplasten mit grosser Schnelligkeit eindringen, während für solche Verbindungen, welche zwar im Wasser leicht, in fettem Öle gar nicht oder nur wenig löslich sind, der Protoplast nicht merklich oder nur äusserst langsam durchlässig ist". Die von Overton und H. H. Meyer gefundene Tatsache, dass die Wirkung vieler Narkotica einen Parellelismus zu dem Teilungscoefficienten zwischen Öl und Wasser erkennen

[1]) Hermann Wieland: Untersuchungen über die lipoiden Substanzen der Magenschleimhaut. Diss. Strassburg. 1909.

lässt, hat der „Lipoidtheorie“ grosse Verbreitung verschafft.

Wie man sieht, hat sich der „Lipoidbegriff“ auf Grund physiologischer Erwägungen entwickelt. In der Tat kann man, wie auch Bang[1]) hervorhebt, die als „Lipoide“ bezeichneten Stoffe nur vom physiologischen Gesichtspunkte aus als eine halbwegs einheitliche Gruppe betrachten, denn in ihrer chemischen Konstitution sind sie ausserordentlich verschieden.

Zwar hat Bang versucht die Lipoidstoffe auch nach ihrem chemischen und physikalischen Verhalten zusammenzufassen, indem er als Lipoide solche Verbindungen bezeichnet, „welche in organischen Lösungsmitteln, wie Äther, Alkohol, Chloroform und Benzol löslich sind“. Aber diese Definition hält nicht einmal den von Bang hierher gezählten Stoffen gegenüber Stich. So ist z. B. Cerebron in Äther unlöslich, Kephalin ebenso in Alkohol, abgesehen von der durchaus willkürlichen Wahl der Lösungsmittel unter denen z. B. Aceton ausgeschlossen ist. Dabei wird eine für die angenommene physiologische Bedeutung der Lipoide wesentliche Eigenschaft — die Unlöslichkeit oder Schwerlöslichkeit in Wasser — unverdientermassen in den Hintergrund gestellt. Freilich hätte es seine grossen Bedenken gehabt, dieses im wesentlichen negative Moment in den Mittelpunkt der Definition zu stellen.

Diese Schwäche der chemischen Charakterisierung steht in grellem Kontrast zu der grossen funktionellen

[1]) Ivar Bang: Chemie und Biochemie der Lipoide. Wiesbaden. 1911.

Bedeutung, die man den Lipoiden beilegt. Als sichergestellt kann gelten, dass hierher gehörige Stoffe — bei weitem nicht alle — an dem Aufbau des Protoplasmas beteiligt sind. Nach den Gesetzen der Oberflächenspannung häufen sich die fettähnlichen Stoffe an der Oberfläche der Zelle an. Damit steht die von Overton auf Grund von Versuchen ausgesprochene Meinung im Einklang, wonach jede lebende Zelle von einer Lipoidschicht begrenzt ist. Die nicht geringe Bedeutung dieser „Membran" wird in ihrer elektiven Durchlässigkeit gesucht. Die Aufnahme von Stoffen durch die Membran wird dadurch von dem osmotischen Druck unabhängig gemacht. Die Natur der Membran entscheidet über die in die Zelle eintretenden Säfte und damit über die Ernährung der Zelle, wodurch sich der spezifische Stoffwechsel der einzelnen Zellen in einfacher Weise deuten lässt. Von diesem Gesichtspunkt aus erscheint die Kenntnis der Lipoide der verschiedenen Gewebe von grosser Wichtigkeit, vor allem jener Gewebe, welche durch Bildung bestimmter chemischer Stoffe an dem Stoffwechsel — an äusserer und innerer Sekretion — Anteil haben. Dass von ihnen die Aufnahme und dann die Wirkung toxischer Stoffe abhängen soll, tritt in der Theorie der Narkose von Overton und H. H. Meyer besonders hervor.

Andere bedeutungsvolle Funktionen weist man den Lipoiden wegen ihrer colloidalen Beschaffenheit in wässerigen Emulsionen zu. Ihre feine Verteilung befördert colloidale Reaktionen: sie kann daher solche Reaktionen wie z. B. Immunitätsreaktionen, Agglutination, Haemolyse

und ähnliche wesentlich befördern oder hemmen. Bei der grossen Oberflächenausbreitung derartiger Emulsionen ist eine Beeinflussung von katalytischen und fermentativen Wirkungen durch Adsorption zu erwarten und es ist daher nicht auffallend, dass man sie mit solchen Reaktionen in Beziehung gebracht hat. Da es sich bei allen solchen Fällen um unreine Gemenge handelt, die einer exakten Untersuchung nicht zugänglich sind, bleibt fraglich, ob sich diese Vorstellungen als haltbar erweisen werden.

Bei der grossen Verschiedenheit der Lipoide unter sich, ist zu erwarten, dass solche Wirkungen durchaus nicht allen Lipoiden in gleichem Sinne zukommen. Sie können sogar einen antagonistischen Charakter tragen. Cholesterin z. B. hemmt die Haemolyse, Lecithin befördert sie unter Umständen. Die antitoxische Wirkung der Rückenmarksemulsion gegen Tetanustoxin lässt sich auf bestimmte Gehirnlipoide z. B. Cerebron zurückführen. Dass dabei die mechanische Verteilung eine sehr grosse Rolle spielt, ist ohne weiteres einzusehen. Im ganzen kann man auch der physiologischen Einheitlichkeit der Lipoide kein Vertrauen entgegenbringen.

Wie sehr der Versuch, die Lipoide nach chemischen Gesichtspunkten zusammenzufassen, misslingen muss, lehrt jeder Versuch einer chemischen Gruppierung.

Overton dachte ursprünglich bei „Lipoiden“ nur an Cholesterin und Lecithin; die Fette und fettsauren Seifen waren durch die Bezeichnung „fettähnliche Stoffe“ ausgeschlossen. Bang hingegen rechnet Fette und Fett-

säuren dazu, während Abderhalden[1]) die Cholesterine und ihre Ester ausschliesst. Es wäre daher zweckmässig, diesen Sammelnamen fallen zu lassen und stets nur direkt von den hierher gehörigen wohl charakterisierten Gruppen zu sprechen:

Als solche Gruppen kann man unterscheiden:

1. Die Cholesterine (Sterine). Am bekanntesten unter ihnen ist das Cholesterin (C_{27} H_{46} O), ein hochmolekularer, ungesättigter Alkohol. Ihm ähnlich ist das aus dem Wollfett erhaltene Isocholesterin, welches aber nicht die charakteristische Farbenreaktion gibt, ferner das in den Fäces nach Cholesterinfütterung gefundene Koprosterin, welches als reduziertes Cholesterin betrachtet wird. Auch in den Pflanzen wurden Sterine nachgewiesen, so besonders im Weizen und Roggen, in der Calabarbohne, im Rüböl und im Mutterkorn.

Von Estern des Cholesterins wurden im Blutserum und in verschiedenen Organen Palmitat, Stearat und Oleat gefunden.

Die Cholesterine und deren Fettsäureester sind in Wasser unlöslich, auch nicht darin quellbar. Sie sind durch ihre ausserordentliche Resistenz gegenüber chemischen Eingriffen ausgezeichnet.

2. Die Cerebroside. Charakteristisch für sie ist, dass sie beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure Galaktose

---

[1]) Abderhalden: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Auflage, 1909.

abspalten. Das von Thierfelder[1]) aus dem Gehirn extrahierte Cerebron liefert bei der Spaltung Galaktose, Cerebronsäure und einen stickstoffhaltigen ungesättigten Alkohol, das Sphingosin.

Die Cerebroside sind in Wasser quellbar, gegen die im Körper wirksamen Fermente nicht empfindlich. Sie finden sich in grossen Mengen im Nervenmark, doch sind sie auch an anderen Orten, z. B. im Eiter (Kossel und Freytag[2]) nachweisbar.

3. Sehr viel untersucht und benannt, aber keineswegs in jeder Richtung aufgeklärt sind die Lipophosphatide. Es sind dies Phosphorsäureester, welche ein oder mehrere Moleküle Phosphorsäure, einen Alkohol (meist Glycerin) ein oder mehrere Fettsäureradikale und ein oder mehrere stickstoffhaltige Basen (Cholin und Oxaethylamin) enthalten. Seit Thudichum[3]) unterscheidet man mehrere Gruppen nach ihrem Gehalt an Phosphor und Stickstoff von denen jedoch nur wenige ausreichend chemisch charakterisiert sind:

1. Monoaminomonophosphatide (1 N : 1 P). Dazu gehören: Lecithin, Kephalin Paramyelin, Myelin, Vesalthin

---

[1]) Thierfelder und Wörner: Zeitschrift für physiologische Chemie, **30**, 542, 1900; Thierfelder: ebenda, **43**, 21, 1904; **44**, 366, 1905; **46**, 518, 1905; Thierfelder und Kitagawa: ebenda, **49**, 286, 1906; Thierfelder und Loening: ebenda, **68**, 464, 1910; **74**, 282, 1911; **77**, 202, 1912.

[2]) Kossel und Freytag: Zeitschrift für physiolog. Chemie, **17**, 453, 1893.

[3]) Thudichum: Die chemische Konstitution des Gehirnes. Tübingen. 1901.

(im Rinderpankreas nach Fränkel und Pari[1]) und ein von Erlandsen[2]) aus dem Herzmuskel gewonnenes acetonlösliches Lipoid.

2. Monoaminodiphosphatide (1 N : 2 P). Die wichtigsten sind: das Cuorin (Erlandsen), ein Heparphosphatid von Baskoff[3]), sowie ein Lipoid aus dem Eigelb von Mac Lean[4]).

3. Diaminomonophosphatide (2 N : 1 P). Der Hauptrepräsentant ist das von Thudichum zuerst gefundene Sphingomyelin aus dem Gehirn. Daneben sind beschrieben: Amidomyelin im Gehirn (Thudichum[5]), ein hierher gehöriges Lipoid im Eigelb nach Thierfelder[6]), ein weiteres aus dem Herzmuskel nach Erlandsen. Endlich ein von Fränkel[7]) in der Niere gefundenes Lipoid, sowie das Diaminophosphatid der Eisbärengalle nach Hammarsten[8]).

4. Triaminophosphatide. Als solches gilt das im Eigelb enthaltene Neottin (3 N : 1 P) nach Fränkel und Bolaffio[9]), das jedoch einer Nachprüfung bedarf, sowie

---

[1]) Fränkel und Pari: Biochem. Zeitschrift, **17**. 68, 1909.

[2]) Erlandsen: Zeitschrift für physiolog. Chemie, **51**, 71, 1907.

[3]) Baskoff: Zeitschrift für physiolog. Chemie, **57**, 429, 1908.

[4]) Mac Lean: Zeitschrift für physiolog. Chemie, **59**, 223, 1909.

[5]) Thudichum: a. a. O.

[6]) Thierfelder und Stern: Zeitschrift für physiologische Chemie, **53**, 384, 1907.

[7]) Fränkel und Nogueira: Biochemische Zeitschrift, **16**, 366, 1909.

[8]) Hammarsten: Zeitschrift für physiologische Chemie, **36**, 528, 1902.

[9]) Fränkel und Bolaffio: Biochem. Zeitschrift, **9**, 45, 1908.

das Triaminodiphosphatid (3 N : 2 P), welches nach Fränkel und Bolaffio in der Niere vorkommt.

Neben den genannten Gruppen hat man vielfach noch kompliziertere Verbindungen beschrieben, die sich in dieses Schema nicht einfügen lassen, z. Beisp. Verbindungen von Phosphatidcharakter mit Kohlehydraten und Eiweiss. In der Regel ist man zur Aufstellung dieser Verbindungen gekommen, weil es sich als unmöglich erwies, sie durch Lösungsmittel weiter zu reinigen und in ihre Komponenten zu zerlegen. Wer die Fähigkeit der Phosphatide kennt, die Löslichkeit anderer Stoffe zu beeinflussen, wird dieses Moment nicht für ausschlaggebend ansehen. So konnte Frank[1]) noch nach zehnmaligem Umfällen von „Jecorin“ aus Alkohol und Äther Kochsalz entfernen, und konnte zeigen, dass das Kephalin die Löslichkeit von Glykogen in Äther vermittelt.

Ebenso ist bei der colloiden Beschaffenheit der Phosphatide verständlich, dass innige Gemenge davon mit coaguliertem Eiweiss einer Extraktion aus den Gerinnseln den zähesten Widerstand leisten. So darf man das Jecorin Drechsels als erledigt betrachten und aus der Reihe der Lipoide streichen; und das Lecithalbumin der Magenschleimhaut, dem Liebermann[2]) eine grosse physiologische Bedeutung für die Magensaftsekretion zuschrieb, hat schon dadurch seine Existenzberechtigung verloren, weil der Nachweis von Lecithin in der Magen-

[1]) Frank: Biochem. Zeitschrift, **50**, 273, 1913.

[2]) L. Liebermann: Pflügers Aschw., **50**, 25 und 55, 1891; **54**, 573, 1893.

mucosa kaum zu erbringen ist. Über die weit besser untersuchten Stoffe der Protagongruppe, die Verbindungen von Phosphatiden mit Galaktosen darstellen sollen, wird unten ausführlicher die Rede sein.

Die Untersuchung der Magenmucosa auf Phosphatide und Cerebroside bereitet nicht geringe Schwierigkeiten. Zum Teil sind diese dadurch begründet, dass das Gewebe der Magenschleimhaut, wenigstens der vom Schwein, welche mit Vorliebe verwendet wurde, viel echtes Fett enthält, überdies noch Lipasen, die eine Spaltung der Fette bewirken, so dass alle Phosphatid- und Cerebrosidfraktionen mit Fetten und Fettsäuren verunreinigt sind.

In der eingangs angeführten Dissertation hat H. Wieland folgende Befunde erhoben:

1. Der Acetonextrakt enthält Phosphatide in geringer Menge. Cholesterin und gespaltene Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol-, Linolensäure).

2. Der Ätherextrakt ist phosphorfrei. Er enthält ein Fett vom Schmelzpunkt 62° und eine als „cetylalkoholähnlichen Körper“ bezeichnete Substanz, welche zufolge einer mündlichen Mitteilung später als eine schwer verseifbare Fettsäure erkannt wurde.

3. Der Alkoholextrakt enthält Fett, sowie einen acetonunlöslichen aber petrolätherlöslichen Teil, welcher Phosphor und Stickstoff im Verhältnis 1 zu 4,4 aufweist. Daneben wurde Leucin gefunden, Tyrosin nicht.

Der Nachweis von Lecithin, Kephalin und Cerebrosid konnte nicht erbracht werden. Dieser auffallende Mangel

an Lipoiden, der mit Liebermanns Angaben im Widerspruch steht, gab die Veranlassung zu einer Fortführung der Wieland'schen Arbeit, die ich auf Anregung von Herrn Prof. Hofmeister vor 3 Jahren begann.

Im ganzen habe ich zwei Darstellungsversuche durchgeführt. Der erste diente zur Orientierung über die vorhandenen Substanzen und die anzuwendenden Methoden. Der zweite mit grösseren Mengen Ausgangsmaterial angestellte bezweckte die Feststellung und Charakterisierung einiger wichtigerer Produkte.

I. Versuch.

Die Schleimhaut von 25 Schweinemägen wurde sorgfältig abpräpariert, von anhaftendem Schleim befreit und in noch lebenswarmem Zustande zur Fixierung in Aceton gelegt. Das Aceton wurde wiederholt abgegossen und durch frisches Aceton ersetzt, bis es nach ungefähr 14 Tagen sich nicht mehr trübte, sondern klar blieb, ein Zeichen, dass dem Gewebe das Wasser entzogen war. Hierauf wurde das Aceton von der Schleimhaut im Koliertuch abgepresst und die Masse im Faust'schen Apparat bei 30° getrocknet, in der Mühle zu feinstem Staub zermahlen und dann der Reihe nach mit Aceton, Äther und Alkohol extrahiert.

Die Aceton-Extrakte wurden im Vakuum bei 30 – 35° eingeengt. Dabei fiel ein weisser, kristallinisch flimmernder Körper aus, der durch Filtration von der

heissen Acetonlösung getrennt wurde. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Alkohol blieb der Schmelzpunkt bei 147° konstant. Die Liebermann'sche, sowie die Salkowski'sche Reaktion waren stark positiv. Es handelte sich also um Cholesterin. Aus dem eingeengten Acetonfiltrat fiel in der Kälte ein dichter, gelber Niederschlag aus, der nach dem Abfiltrieren der übrigen Lösung als Brei auf dem Filter zurückblieb, aber in der Wärme zu einem roten Öl zerfloss. Erst nachdem die noch gekühlte feste Masse auf Tonplatten mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt, und auf diese Weise das dem Brei anhaftende Öl abgesaugt worden war, konnte der nunmehr auch bei Zimmertemperatur feste Körper von den Platten abgenommen werden. Aus Alkohol kristallisierte er in doppelbrechenden Plättchen aus, deren Lösung stets sauer reagierte. Nach wiederholtem Umkristallisieren war der Schmelzpunkt von 58° bis auf 69,5° gestiegen und blieb dann konstant. Der Mischschmelzpunkt mit der ebenfalls bei 69,5° schmelzenden Stearinsäure lag wieder bei 69,5°, sodass dadurch der Nachweis reiner Stearinsäure erbracht war. Das von den Tonplatten absorbierte Öl wurde durch Alkoholextraktion wieder gewonnen. Nach der Verseifung desselben wurden Säuren erhalten, deren Bleiseifen sich als ätherlöslich erwiesen, und die deshalb als ungesättigte Säuren anzusehen sind. Eine Überführung in ätherlösliche Barytseife gelang nicht, so dass die Anwesenheit von Linol-, resp. Linolensäure, nicht anzunehmen ist.

Der Rest des Acetonextraktes wurde zur Trockne eingeengt und hinterliess ein dunkelrotes Öl, welches

deutliche Cholesterinreaktion gab. Nach vierstündiger Verseifung mit alkoholischer Kalilauge wurde die wässerige Seifenlösung mit Äther ausgeschüttelt. Der abgehobene Äther enthielt nur geringe Mengen von Cholesterin, aber kein Glycerin. Die Akroleinprobe war negativ. Der Verdacht lag also nahe, dass der Rückstand des Acetonextraktes kein Fett, sondern nur Fettsäuren enthalten hatte, und es ergab sich die Frage, ob diese Fettsäuren primär in der Magenschleimhaut vorhanden oder erst sekundär während der Verarbeitung des Materials und der Extraktion infolge von Fettspaltung entstanden seien. Die Beantwortung dieser Frage wurde dem später beschriebenen zweiten Versuche vorbehalten.

Die mit Aceton erschöpfte Schleimhaut wurde mit Äther im Schüttelapparat extrahiert, und der nach dem Einengen der Extrakte erhaltene Rückstand mit 95% Alkohol verrieben; die alkoholische Lösung hinterliess beim Verdunsten ein nicht näher untersuchtes Öl. Der in kaltem Alkohol nicht lösliche Teil war ein farbloser Körper, welcher deutliche Akroleinreaktion gab und von dem nach der Verseifung Fettsäuren vom Schmelzpunkt zirka 58 Grad erhalten wurden. Trotz wiederholtem Umkristallisierens konnte weder der Schmelzpunkt des Fettes noch der der Säuren konstant erhalten werden.

Nach der Ätherextraktion wurde die Schleimhaut mit absolutem Alkohol behandelt, worauf die Auszüge im Vakuum eingeengt wurden. Der dabei ausfallende Körper, welcher die ganze Kolbeninnenwand bekleidete, war in Wasser löslich und wurde später als Leucin erkannt. Die Tyrosinprobe aber war negativ. Der zur

Trockne gebrachte Alkoholextrakt war in kaltem Äther zum Teil löslich. Der unlösliche Teil, ein gelber Brei, wurde mit Chloroform extrahiert. Aus der Chloroformlösung wurde ein gelblicher Körper erhalten, der Phosphor und Stickstoff enthielt und nach Spaltung mit Schwefelsäure deutliche Trommer'sche und Molisch'sche Zuckerreaktionen gab. Die Substanz wurde zunächst für ein Gemenge von Phosphatiden und Cerebrosiden gehalten und zur Trennung nach der von Thierfelder angegebenen Methode aus 30% Chloroform enthaltendem Methylalkohol umkristallisiert. Trotz 30maligem Umkristallisierens konnte der Phosphorgehalt nicht beseitigt werden und der Schmelzpunkt von anfangs 182 Grad stieg beim Umkristallisieren konstant.

Der in Äther lösliche Teil des Alkoholextraktes wurde zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit kaltem Aceton fraktioniert. In dem acetonlöslichen Teil konnten Leucin und Aminosäuren nachgewiesen werden, sowie eine in Äther lösliche Substanz mit deutlichem Phosphor- und Stickstoffgehalt.

Die in kaltem Aceton unlösliche Fraktion erschien in Gestalt gelber Flocken, und wurde zunächst für Kephalin gehalten. Bei Behandlung mit kaltem Äther erwies sie sich indessen als ein Gemenge von ätherlöslichem Fett und dem schon oben erwähnten ätherunlöslichen cerebronartigen Körper. Die vorübergehende Löslichkeit im Äther war offenbar durch die Gegenwart des Fettes bedingt.

Da die angegebene Methode zur Fraktionierung des Alkoholextraktes sich als ungeeignet erwiesen hatte,

wurde für die nächsten Auszüge eine neue Methode gewählt. Nachdem sie bei etwas höherer Temperatur (zirka 40 Grad) eingeengt worden waren, fiel beim Erkalten ein grauweisser Körper in dichten Wolken aus, eine Erscheinung, die vorher schon einmal zufällig beobachtet, deren Bedeutung aber erst später erkannt worden war. Die heisse konzentrierte alkoholische Lösung wurde aus dem mit dickem Leucinbelag ausgekleideten Destillierkolben abgegossen und heiss filtriert. Der aus dem Filtrat in der Kälte ausfallende Niederschlag wurde auf dem Filter gesammelt und, da er sich alsbald als der gesuchte cerebronartige Körper erwies, nach der Thierfelder'schen Methode umkristallisiert. Aus der alkoholischen Mutterlauge fiel bei weiterem Einengen dieselbe Substanz aus. Der Schmelzpunkt, welcher erst bei 180° gelegen hatte, stieg beim Umkristallisieren beständig an, ohne dass eine Konstanz erreicht werden konnte.

Der Nachweis von Kephalin und Lecithin konnte nicht erbracht werden.

II. Versuch.

Die mitgeteilten Beobachtungen veranlassten mich mit einem noch grösseren Material eine zweite Untersuchung der Magenschleimhaut vorzunehmen. Das Hauptinteresse galt dem cerebronartigen Körper des Alkoholextraktes. Ausserdem aber sollte eine sorgfältigere Trennung von Fett und Fettsäure im Acetonextrakt vorgenommen werden. Dabei sollte besonders die Möglichkeit einer Zersetzung der

Fette durch hohe Temperaturen, durch Kochen mit Alkohol usw. ausgeschlossen werden. Im übrigen sollten auch die wasserlöslichen Substanzen der Magenschleimhaut einer eingehenderen Untersuchung unterzogen werden.

Die Schleimhaut wurde in derselben Weise wie früher behandelt und zunächst wieder mit Aceton extrahiert.

Zur Trennung von Fett und Fettsäure wurden die Acetonextrakte mit kalter Natronlauge geschüttelt und die dabei sofort entstehenden Niederschläge von Seifen durch Filtration von der Acetonlösung getrennt. Als ein weiterer Zusatz von Natronlauge keine Fällung mehr bewirkte, wurden die auf den Filtern gesammelten Seifen in Wasser gelöst und mit Bariumchlorid fraktioniert gefällt. Aus den einzelnen Fraktionen wurde erhalten:

1. Substanz A: Gemenge von Fettsäuren (Smp. 58°).
2. Substanz B: Palmitinsäure (Smp. 61 $^1/_2$ °).
3. Substanz C: Stearinsäure (Smp. 69 $^1/_2$ °).

Das Acetonfiltrat wurde mit verdünnter Schwefelsäure zu neutraler Reaktion gebracht und eingeengt. Das dabei ausfallende Cholesterin wurde in einer Menge von 2 bis 3 gr erhalten. Der Rest des Acetonfiltrats hinterliess beim Einengen eine braune, körnige Masse, welche Fettgeruch und beim Verbrennen deutlichen Akroleingeruch gab. Der gesamte Rückstand wurde in der Reibschale mit warmem Wasser verrieben und die wässerige Lösung abgegossen. Sie enthielt Eiweiss und Salze, vorzüglich Phosphate.

Der in Wasser unlösliche Teil war in heissem Petroläther vollkommen löslich. Beim Stehen kristallisierte ein weisser Körper in Kugelform aus, der sich als doppelbrechend erwies. Er war löslich in heissem Äther und fiel bei Zusatz von Alkohol und besonders von Aceton aus. Auf letztere Weise wurde er wiederholt gefällt und zuletzt aus Äther umkristallisiert. Der Schmelzpunkt blieb dann bei $66\,^1/_2\,^0$ konstant. Beim Verbrennen trat deutlicher Akroleingeruch auf. Gegen Lakmus und Phenolphtalein war neutrale Reaktion vorhanden. Phosphor- und Stickstoffprobe waren negativ. Die Analyse ergab folgende Werte:

C = 76,0
H = 11,80 Tristearin verlangt:
O = 12,16 C = 76,8 H = 12,9.

Ein Teil des Fettes wurde verseift. Die dabei erhaltene Fettsäure ergab einen Schmelzpunkt von $58\,^0$, schmolz aber unscharf. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um ein Gemenge von Palmitin- und Stearinsäure gehandelt hat, wofür auch das Aussehen sprach.

Die restierende kalte Petrolätherlösung hinterliess nach dem Verdunsten einen braunen, öligen Körper. Nach der Verseifung mit alkoholischer Kalilauge konnten ätherlösliche Blei- und Barytseifen erhalten werden.

Nach vollendeter Extraktion der Schleimhaut mit Aceton wurde eine Behandlung mit Äther im Soxhletapparat vorgenommen. Der Rückstand der zur Trockene eingeengten Extrakte wurde mit warmem Aceton behandelt. Der hierin lösliche Teil bestand aus Cholesterin und

Fettsäure, sowie Fett. Die Phosphorprobe war in allen Fällen negativ und so wurde von einer weiteren Untersuchung abgesehen.

Der in warmem Aceton unlösliche Teil erwies sich als das im Acetonextrakt bereits gefundene Fett vom Schmelzpunkt $66\,^1/_2\,^0$.

Mit Rücksicht auf den besonders zu untersuchenden cerebronartigen Körper wurde zur Fraktionierung eine vom ersten Versuch abweichende Methode ausgearbeitet, welche sich als sehr zweckmässig erwies. Zwei Momente waren es, welche für dieselbe ausschlaggebend waren:

1. die absolute Unlöslichkeit des Körpers im Äther und
2. seine Eigenschaft, im Wasser zu quellen.

134 gr des zur Trockne eingeengten Alkoholextraktes wurden viermal 24 Stunden im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Der dabei erhaltene Rückstand musste den Körper enthalten, während die übrigen Fette sich im Äther vorfinden mussten. Der Rückstand, eine körnige, braune Masse, wurde in der Reibschale mit lauwarmem destilliertem Wasser wiederholte Male verrieben und die abgegossene trübe, wässerige Lösung filtriert. Als sich die Filter verstopften, wurden die Lösungen mit Talkum geschüttelt, wonach eine schnellere Filtration erreicht wurde. Dies Verfahren erwies sich für die Reinigung des cerebronartigen Körpers später als äusserst günstig, was vielleicht durch ein rein mechanisches Moment zu erklären ist: bei der Quellung im Wasser und der damit verbundenen Auflockerung und Vergrösserung der Ober-

fläche werden die anhaftenden Verunreinigungen leichter abgegeben. Von Bedeutung wird aber auch die Entfernung der Eiweisskörper sein, welche oft sehr innig den „Lipoiden" anhaften. Dass die Anwesenheit von Wasser auf die Löslichkeit der Lipophosphatide von bestimmendem Einfluss ist, wird von Thudichum und Ivar Bang angegeben.

Der im Wasser unlösliche Rückstand wurde in heissem Alkohol gelöst. Beim Abkühlen fiel ein rein weisser kristallinischen Niederschlag aus, der nach dem Abfiltrieren der alkoholischer Lösung und nach einmaligem Umkristallisieren aus Thierfelder'scher Lösung (chloroformhaltigem Methylalkohol) einen Schmelzpunkt von 189—190° zeigte. Er gab starke Phosphor- und Stickstoffreaktion, sowie nach der Spaltung mit Mineralsäure deutliche Zuckerreaktionen. Nach seinem Aussehen und seiner absoluten Unlöslichkeit in kochendem Äther wurde er für Cerebron gehalten. Der niedere Schmelzpunkt — Thierfelder gibt für das aus dem Gehirn gewonnene Cerebron den Schmelzpunkt 212° an — wurde auf eine Verunreinigung mit Phosphatiden bezogen. Zur weiteren Reinigung wurde wieder das Thierfelder'sche Lösungsmittel verwendet. Beim Filtrieren der heissen Lösung blieb auf dem Filter ein brauner Rückstand, der zunahm, als der Chloroformgehalt des Lösungsmittels auf 50% erhöht wurde. (Es wurden stets frisch destillierte und völlig wasserfreie Lösungsmittel verwendet.) Der Schmelzpunkt der erhaltenen Kristallisationsprodukte schwankte gelegentlich zwischen 180 und 192°, hielt sich jedoch meist in den Grenzen von 190 und 191°. Da nach

15maligem Umkristallisieren der Phosphorgehalt noch immer nicht beseitigt war, so wurde eine von Thierfelder früher angegebene Methode zugezogen. Die Substanz wurde in 30% Chloroform enthaltendem Methylalkohol heiss gelöst und zu der kochenden Lösung 1 ccm des von Thierfelder empfohlenen Zinkreagens (ammoniakalische Zinklösung) zugesetzt. Die alsbald auftretenden Flocken wurden durch Filtration der kochenden Lösung beseitigt und es wurde aus der letzteren das freie Ammoniak durch Kochen und Durchleiten eines Luftstroms vertrieben, wobei noch Zinkoxyd ausfiel. Das beim Kochen verdunstete Chloroform wurde ergänzt und die kochende Lösung filtriert. Beim Abkühlen fiel aus dem Filtrat ein rein weisser, kristallinischer Niederschlag aus. Die Kristalle waren schön doppelbrechend und erschienen unter dem Mikroskop in Gestalt scharf begrenzter Sphärite. Der Schmelzpunkt lag bei 191 ½°; beim Verbrennen trat deutlich Akroleingeruch auf. Phosphor- und Stickstoffprobe erwiesen sich als stark positiv und hatten offensichtlich seit der letzten Reinigung an Intensität bedeutend zugenommen. Auch die Molisch'sche und Trommer'sche Probe nach Spaltung mit Schwefelsäure waren viel stärker, als sie irgend vorher gefunden worden waren. Die von Thierfelder gerade zur Beseitigung anhaftender Phosphatide angegebene Methode hatte hier den Phosphor nicht beseitigen können, ein Zeichen, dass derselbe chemisch gebunden ist. Sie hatte sogar ohne Zweifel eine beträchtliche Zunahme der Reinheit bewirkt. Bei weiteren Kristallisationsversuchen aus absolutem und verdünntem Alkohol, aus Thierfelder'scher Lösung, aus reinem Methylalkohol und reinem Chloroform wurde kein weiteres Ansteigen

des Schmelzpunktes beobachtet. Andere Lösungsmittel wie Benzin, Ligroin, Pyridin versagten bei Kristallisationsversuchen, da auch aus stark konzentrierten Lösungen in der Kälte kein Niederschlag entstand. Die bei der Analyse nach Pregl ermittelten Werte sind:

6,274 mg: 0,168 ccm N (728 mm, 22°) = 2,97% N,
4,086 mg: 0,092 ccm N (740 mm, 18°) = 2,57% N,
1,432 mg: 1,38 mg H_2O = 3,36 CO_2 = 10,79% H; 63,99% C.

Da dieser Stoff dem Protagon der Autoren so nahe steht, so sei hier auf die Protagonfrage näher eingegangen.

Bekanntlich wird das Protagon trotz seiner kristallinischen Beschaffenheit nicht als chemisch reiner Körper, sondern als ein Gemenge von Phosphatiden und Cerebrosiden angesehen.

Für die Einheit des Protagons wird geltend gemacht die Konstanz des Schmelzpunktes und der Umstand, dass nach Cramer, Gies und Lesem und Anderen wiederholtes Umkristallisieren die Zusammensetzung der Substanz nicht ändert.

Dagegen spricht:

1. Das sehr hohe Molekulargewicht von zirka 6000;
2. der Umstand, dass ein Gemenge von Sphingomyelin und Cerebrosiden dieselben Eigenschaften zeigt, wie das Protagon selbst (Rosenheim und Tebb);

3. dass es bei einfachem Umkristallisieren aus indifferenten Lösungsmitteln sofort in verschiedene kristallinische Produkte zerfällt;

4. die Inkonstanz des Schwefelgehaltes bei verschiedenen Kristallisationsprodukten;

5. die von Rosenheim und Tebb festgestellte Abnahme des Phosphorgehaltes nach wiederholtem Umkristallisieren aus Alkohol.

Alle diese Umstände würden für die Annahme eines Phosphatid-Cerebrosid-Gemenges sprechen, wenn nicht der Einwand gemacht werden könnte, dass bei Anwendung der Reinigungsverfahren und der Einwirkung heissen Alkohols eine Spaltung stattgefunden habe.

Im Jahre 1910 wurde von Dunham und Jacobson im Rockefeller-Institut ein in der Rinderniere vorkommendes Phosphocerebrosid entdeckt, welches als Carnaubon bezeichnet wurde und dessen Analysenzahlen sind:

C = 67,12 %	H = 11,54 %
P = 2,18 %	N = 2,48 %

Der Körper wurde im Alkoholextrakt gefunden und kristallisierte aus Alkohol aus. Nach wiederholtem Umkristallisieren wurde ein konstanter Schmelzpunkt von 189° erhalten. Die Annahme, dass es sich um eine chemische Verbindung und nicht um ein Gemenge handelte, wurde durch zahlreiche Analysen verschiedener Kristallisationsprodukte erbracht.

Ihm steht der von mir gefundene phosphorhaltige cerebrosidartige Körper in Eigenschaft und Zusammen-

setzung am nächsten. Wie aus den Analysenzahlen zu ersehen, ist der Kohlenstoffgehalt merklich höher. Eine Identifizierung ist daher vorderhand ausgeschlossen. Die Frage, ob es sich dabei um einen chemisch einheitlichen Körper handelt, kann im Hinblick auf die entmutigende Protagonliteratur nur mit Zögern beantwortet werden. Für die Einheitlichkeit spricht der hohe, nach 30 maligem Umkristallisieren konstant bleibende Schmelzpunkt und die Unmöglichkeit auch mit dem besten Hilfsmittel (ammoniakalischem Zink) den Phosphorgehalt zu beseitigen.

Dabei sei noch auf eine für die Schmelzpunktbestimmungen bedeutungsvolle Eigenschaft aufmerksam gemacht. Nach längerem Erhitzen über 155° tritt eine Zersetzung ein und die dabei entstehenden Produkte geben einen unscharfen Schmelzpunkt von 175 - 176°. Daraus erklären sich Unstimmigkeiten der Bestimmung, die man bei schnellem Erwärmen des Schmelzkolbens vermeiden kann. In der letzten Zeit wurden die Bestimmungen rasch ausgeführt und dabei ein schnelles, reines Schmelzen fast sämtlicher Kristallisationsprodukte beobachtet bei 191 ½°.

Um noch die letzten Mengen der Substanz, von der nur 0,5 gr gefunden worden waren, zu erhalten, wurden alle zur Filtration gebrauchten Filter mit Alkohol extrahiert. Die daraus gewonnene Substanz wurde wie früher gereinigt und schmolz bei 191 ½°. —

Aus den bei der Soxhletextraktion gewonnenen Ätherauszügen fiel in der Kälte ein rein weisser Körper aus. Er wurde abfiltriert und als das bereits im Acetonextrakt

vorgefundene Fett vom Schmelzpunkt 66 1/2° erkannt. Um den Körper quantitativ zu erhalten, wurde eine Fällung mit Aceton vorgenommen und, als in den ätherischen Mutterlaugen keine Fällung mehr entstand, wurde die Ätherlösung zur Abtrennung von Fettsäuren mit kalter Natronlauge geschüttelt. Die aus der wässerigen Seifenlösung gewonnenen Säuren erwiesen sich als Stearin-, Palmitin-, Öl-, Linol- resp. Linolensäure. Zum Nachweis von Carnaubasäure, wie sie aus dem von Dunham und Jacobson gefundenen Carnaubon abgespalten werden kann, wurde das von den genannten Autoren zur Trennung angegebene Verfahren benützt, das auf der Unlöslichkeit des carnaubasauren Lithiumsalzes in kochendem 50%igem Alkohol beruht. Der Nachweis freier Carnaubasäure konnte jedoch nicht erbracht werden und zu einer Veresterung reichte die geringe Menge der erhaltenen Substanz nicht aus.

Die wässerigen Auszüge wurden eingeengt und zur Beseitigung des ausfallenden Eiweisses filtriert. Der Rückstand der zur Trockne gebrachten Filtrate wurde mit 85%igem Alkohol in der Reibschale verrieben und nach Absaugen der alkoholischen Lösung auf der Nutsche wiederholt mit Alkohol nachgewaschen. Es restierte so eine grau-weisse körnige Masse, welche in heissem Wasser löslich war und an ihrer Eigenschaft, beim Erhitzen zu sublimieren, als Leucin erkannt wurde. Zum sicheren Nachweis desselben wurde das Kupfersalz dargestellt und nach wiederholtem Umkristallisieren aus wässeriger Lösung im Platintiegel verbrannt. Der auf diese Weise ermittelte Kupfergehalt betrug 19,4% (bez. 19,6%).

Die abgesaugte alkoholische Lösung wurde wieder zur Trockne eingeengt, und der körnige Rückstand in Wasser aufgenommen. Zum Nachweis von Tyrosin wurde folgende Trennung vorgenommen:

Die angesäuerte Lösung wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat wurde nach Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Baryt zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit Alkohol extrahiert. In der Kälte fielen Leucin und Tyrosin aus. Die Millon'sche sowie die Piria'sche Probe erwiesen sich als positiv.

Zum Nachweis von Diaminosäuren wurde der Niederschlag von Phosphorwolframsäure mit heissem Wasser extrahiert. Das Filtrat gab beim Erkalten einen stickstoffhaltigen Niederschlag, doch in so geringer Menge, dass auf weitere Untersuchung verzichtet werden musste.

Zusammenfassung.

Im allgemeinen konnten die Befunde der Wieland'schen Arbeit bestätigt werden, doch wurden durch die neuen Untersuchungen bestimmtere Angaben über die chemische Zusammensetzung der Magenschleimhaut ermöglicht, die hier noch einmal zusammengefasst sein mögen.

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber der Wieland'schen Methode bestand darin, dass die Acetonextrakte vor ihrer weiteren Fraktionierung nicht verseift, sondern im Gegenteil auf das sorgfältigste vor allen Eingriffen bewahrt wurden, durch welche eine künstliche Spaltung der Fette hätte bewirkt werden können. Auf

diese Weise gelang der Nachweis von freiem Cholesterin und von freien Fettsäuren. Die letztere Beobachtung gab den Anlass zu Untersuchungen über die Entstehung dieser freien Fettsäuren. Darüber wird noch zu berichten sein.

Im Aceton- und im Ätherextrakt sowie im Alkoholextrakt wurde ein Fett vom Schmelzpunkt 66 ½ ° gefunden, welches wohl den wesentlichsten echten Fettbestandteil der Magenschleimhaut darstellt.

Weder im Aceton-, noch im Ätherextrakt konnten Lipoide nachgewiesen werden.

Von Bedeutung erscheint der nunmehr mit Sicherheit erwiesene Mangel an Kephalin und Lecithin nicht allein, weil dadurch die alte Ansicht widerlegt ist, dass diese Lipoide einen wesentlichen Zellbestandteil ausmachen und sich überall verbreitet finden, sondern auch, weil dadurch die Existenz des von Liebermann aus verschiedenen Organen (Lunge, Leber, Niere, Milz und Magenschleimhaut) isolierten Lecithalbumins in Frage gestellt wird. Jedenfalls bedarf es noch einer Nachprüfung an der Hand eines grossen Materials. In der Magenschleimhaut ist der Körper nicht vorhanden, da ja nicht einmal Lecithin als solches angetroffen wurde.

Bekanntlich knüpft sich an das Lecithalbumin eine von Liebermann aufgestellte Hypothese der Salzsäurebildung im Magen. Danach bildet das Lecithalbumin eine Natronverbindung, welche sich in kolloidalem Zustande in der Magenschleimhaut befindet und die durch die Kohlensäure

des Blutes nur langsam angegriffen und zerlegt wird, während freigewordene Salzsäure in das Mageninnere diffundiert. Dass diese Theorie durch das Fehlen des Lecithins einer wichtigen Stütze beraubt wird, ist klar.

Im Alkoholextrakt wurde ein Phosphorcerebrosid vom Verhalten des Carnaubons gefunden. Der Einwand, dass es sich nur um ein Gemenge von Cerebrosid und Phosphatid handeln könnte, kann zurückgewiesen werden, da auch nach Anwendung der verschiedensten Reinigungsverfahren die Beseitigung des Phosphorgehaltes nicht gelang. Im Gegenteil, es wurde mit der Zunahme der Stickstoff- und Glykosidreaktion gleichzeitig ein bedeutender Anstieg der Phosphorreaktion beobachtet. Für die Reinheit der Substanz sprach die Konstanz des Schmelzpunktes, sowie die Beschaffenheit der Kristalle, welche sich unter dem Mikroskop in Gestalt scharf begrenzter Sphärite darstellten und als doppelbrechend erwiesen.

Im Gegensatz zu der bezüglichen Angabe Wielands muss die Frage nach der Anwesenheit des Tyrosins bejaht werden. Ob dieses ebenso wie das in der Magenschleimhaut zuerst von Richet festgestellte Leucin als post mortales Eiweisspaltungsprodukt aufzufassen ist, oder ob es sich in der Magenschleimhaut primär vorgebildet findet, steht dahin.

Zur Frage der Fettsäurebildung in der Magenschleimhaut.

Die grosse Menge freier Fettsäuren, der ich in der Magenschl imhaut begegnet bin, weist auf eine rasche,

post mortem aufgetretene Lipasewirkung hin. Dass sich in der Magenschleimhaut in der Tat eine Lipase vorfindet, wurde von Volhard[1]) nachgewiesen. Durch Einwirkung von Glycerinextrakten der Magenschleimhaut auf Eigelblösung wurde eine deutliche Fettspaltung erzielt. Eine Reihe von mir unternommener Versuche führte zu dem Ergebnis, dass die Magenlipase ihre Wirkung auch auf die Magenfette selbst ausübt. Die Ausführung geschah in folgender Weise:

20 gr Schleimhaut resp. Schleim wurden 20 Minuten mit Quarzsand in der Reibschale verrieben und sodann mit 45 ccm Ringer'scher Lösung und zum Schutz vor Fäulnis mit 5 ccm Toluol in sterilen Flaschen geschüttelt und darauf 24 Stunden im Wasserbad bei 37° gehalten. Darauf wurden die Proben zur Zerstörung der Lipase mit Alkohol 10 Minuten gekocht und im Luftstrom bei 30° zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit Alkohol extrahiert und die filtrierte Lösung wieder zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit Petroläther extrahiert und der eingeengte Extrakt wieder in Alkohol aufgenommen und endlich mit $^1/_{10}$ N-Natronlauge gegen Phenolphtalein titriert. Der Zweck dieses etwas umständlichen Verfahrens war, die Fettsäuren zu isolieren und eine Beimengung der Salzsäure und Milchsäure auszuschliessen. Als Kontrollen dienten Kochproben, bei denen vor Beginn des Versuchs die Lipase zerstört worden war.

---

[1]) F. Volhard: Zeitschrift für klinische Medizin, **42**, 414, 1901; **43**, 397, 1901. Vgl. auch Stade, Hofmeisters Beiträge, **3**, 291, 1903.

Zwei derartige Versuche seien hier in Kürze angegeben:

	Zahl der zur Neutralisation verbrauchten ccm $^1/_{10}$ N NaOH	
I. 20 gr Fundusschleimhaut	Versuch 1	Versuch 2
gekocht	3,3	3,8
ungekocht	8,6	11,2
II. 20 gr Pylorusschleimhaut		
gekocht	2,3	3,4
ungekocht	3,6	6,4
III. 20 gr Schleim		
gekocht	1,4	1,3
ungekocht	4,6	2,5

Ob eine derart geringe Lipasewirkung die gefundene grosse Menge freier Fettsäuren erklären kann, erscheint allerdings fraglich. Indessen darf nicht übersehen werden, dass die Lipase nur 24 Stunden eingewirkt hatte und dass der Zusatz von Toluol eine Hemmung der Lipasewirkung bedingt. Vielleicht ist die von Liebermann beobachtete Säuerung seines Lecithalbumins auf echte Lipasewirkung zu beziehen.

Lebenslauf.

Verfasser der Arbeit „Zur Kenntnis der lipoiden Substanzen der Magenschleimhaut“ wurde in Strassburg am 19. August 1888, als Sohn des dortigen Professors an der Universität Dr. Heinrich Bayer, geboren.

Seine Schulbildung erhielt er am Lyzeum zu Strassburg bis zur Untersekunda. Von da ab besuchte er die Oberrealschule und bestand ebenda im Sommer 1908 die Reifeprüfung. Im Frühjahr 1910 bestand er die vorgeschriebene Lateinprüfung am Lyzeum. Im Herbst 1909 liess er sich an der Universität Strassburg als Student der Medizin immatrikulieren und hörte die Vorlesungen der Herren Professoren Braun, Jost, Goette, Thiele, Schwalbe, Hofmeister und Ewald.

Im Februar 1911 bestand er die ärztliche Vorprüfung in Strassburg, wo er auch den Rest seiner Studienzeit verbrachte.

Die ärztliche Prüfung bestand er am 13. Dezember 1913. Vom 15. Dezember 1913 bis zum 1. April 1914 war er als Medizinalpraktikant am physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg tätig unter Leitung von Herrn Prof. Hofmeister. Am 1. April wurde er Praktikant am hygienischen Institut bei Herrn Prof. Uhlenhuth, wo er vom 1. Mai ab vertretungsweise die Stelle des dritten Assistenten versieht.

Seine Lehrer waren die Herren Professoren Hofmeister, Wenckebach, Madelung, Fehling, Hertel, Schmiedeberg, Chiari, Czerny, Wollenberg, Meyer, Manasse, Wolff, Weidenreich und Bayer.